

Prof. dr hab. inż. Joanna Puławska
Zakład Fitopatologii
Instytut Ogrodnictwa
ul. Konstytucji 3 Maja 1/3
96-100 Skierniewice

Skierniewice 20.05.2019

**Recenzja pracy doktorskiej mgr Agnieszki Emilii Misztak
pt. „Genomics, phenotypic characterisation and microbiome analysis of edible
cyanobacteria from *Arthrospira* genus” / „Genomika, charakterystyka fenotypowa oraz
analiza mikrobiomu jadalnych cyjanobakterii z rodzaju *Arthrospira*”**

Przedstawiona do recenzji praca wykonana w Katedrze Biotechnologii Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego w Gdańsku pod kierunkiem dr hab. Małgorzaty Waleron, dotyczy charakterystyki genomicznej i fenotypowej jadalnych cyjanobakterii z rodzaju *Arthrospira*, uzupełnionej o analizę bioróżnorodności bakterii koegzystujących w środowisku i powiązanych z rodzajem *Arthrospira*. Cyjanobakterie to ciekawa grupa ekstremofilnych mikroorganizmów mających zdolność do fotosyntezy. Zasiedlają one słone i alkaliczne zbiorniki w cieplejszych rejonach świata, a ze względu na zdolność produkcji różnego rodzaju związków chemicznych stały się obiektem badań pod kątem ich różnorodnego zastosowania m.in. jako suplementów diety. Badania nad *Arthrospira* prowadzone są od lat, jednak era nauk omicznych, w tym genomiki, dała naukowcom nowe narzędzia, pozwalające na dokładne poznanie relacji filogenetycznych między szczepami, a także pogłębienie wiedzy na temat ich bioróżnorodności, adaptacji do środowiska i potencjalnych zdolności biosyntezy różnych związków. Praca doktorska mgr A. E. Misztak jest dowodem na to, że zastosowanie nowoczesnych metod biologii molekularnej daje możliwość pozyskania informacji o wysokiej jakości i przydatności, cennych zwłaszcza w przypadku mikroorganizmów, które mogą być tak zróżnicowane i zasiedlać tak wiele nisze ekologicznych.

Rozprawa doktorska Pani mgr Agnieszki E. Misztak przedstawiona została na 148 stronach anglojęzycznego manuskryptu podzielonego na rozdziały w sposób typowy dla prac doświadczalnych. W części teoretycznej wyodrębniono streszczenia w j. angielskim i polskim (**Abstracts**), wprowadzenie (**Introduction**), cel badań (**Aims of the study**). Część doświadczalna z czterema głównymi podrozdziałami: materiały (**Materials**), metody (**Methods**), wyniki (**Results**) i dyskusją (**Discussion**), a także wnioski (**Conclusion**) i spis piśmiennictwa (**Bibliography**) z 207 głównie anglojęzycznymi pozycjami literaturowymi. Praca jest uzupełniona o listy tabeli, rysunków i skrótów stosowanych w pracy, a także o płytę CD z dodatkowymi plikami w formie czternastu aneksów z wynikami poszczególnych analiz, rysunkami i formą elektroniczną rozprawy doktorskiej, co niezwykle sobie cenię, gdyż ułatwiło mi to pracę jako recenzentowi.

Rozdział **Introduction**, jest szesnastostronicowym opracowaniem na temat cyjanobakterii z rodzaju *Arthrospira* - ich biologii, genetyki, problemach związanych z systematyką tych bakterii, wpływu różnych czynników stresowych na ich wzrost, a także praktycznymi możliwościami ich zastosowania jako suplementu diety. W tym ostatnim wątku, Autorka zwróciła uwagę na mikrobiologiczne zanieczyszczenia biomasy mogące być przyczyną problemów hodowli *Arthrospira*, a także stanowić zagrożenie dla przyszłych konsumentów. Doktorantka ciekawie i szczegółowo przygotowała przegląd istniejącego piśmiennictwa, a jego zakres dostosowała do zakresu części badawczej opisanej w rozprawie, jednak w mojej opinii szczegółowy opis zawartości kwasów tłuszczowych u badanej grupy bakterii, które obecnie już jako marker chemotaksonomiczny nie mają większego znaczenia, jest raczej zbędny.

Chociaż praca doktorska mgr A.E. Misztak koncentruje się tylko na cyjanobakteriach należących tylko do jednego rodzaju, Doktorantka podjęła wielkowątkowe badania i postawiła sobie ambitne cele (**Aims of the study**) wymagające zróżnicowanego podejścia i zastosowania wielu technik koniecznych do ich osiągnięcia. Jednym z celów była charakterystyka genomowa bakterii z rodzaju *Arthrospira* w oparciu o dostępne w bazie GenBank i uzyskane w ramach pracy genomy. Kolejne cele to określenie wpływu różnych czynników stresowych na biomasę *Arthrospira* i analiza metagenomiczna zespołu bakterii związanych z *Arthrospira*, czyli Arthrobiomu.

W rozdziałach **Materials** i **Methods**, Autorka szczegółowo opisała stosowane metody i użyte materiały w doświadczeniach. Godna podziwu jest liczba różnych analiz

bioinformatycznych zastosowanych w badaniach, gdyż opanowanie użycia niektórych programów bywa często kłopotliwe. Tutaj chciałabym zadać Doktorantce pytanie, jakie było kryterium wyboru oprogramowania do wykonanych analiz? Czy kierowała się tylko celem jaki chciała uzyskać, czy też skutecznością, poprawnością algorytmów stosowanych w programach? Nawiązując już do wyników uzyskanych dzięki takim analizom, chciałabym się dowiedzieć jaka jest np. wartość wyników detekcji możliwych miejsc rekombinacji z zastosowaniem AlienHunter? Z jakim prawdopodobieństwem miejsca wskazane przez program są rzeczywistymi miejscami rekombinacji i czy jest to możliwe do zweryfikowania?

W rozdziale siódmym – **Results**, mgr A.E. Misztak opisuje uzyskane wyniki z podziałem odpowiadającym założonym celom badań. Uzyskanie sekwencji genomowych dodatkowych pięciu szczepów *Arthrospira* i włączenie do badań razem z istniejącymi ośmioma genomami pozwoliło na uzyskanie wyników dających podstawy do zmian klasyfikacji poszczególnych szczepów. Na podstawie badań ANI i *isDNA*, szczepy nad których genomami pracowała Autorka podzielono na dwie grupy (clade I i clade II, jak na rycinach 19 i 20), które zgodnie z obowiązującymi kryteriami klasyfikacji powinny stanowić dwa gatunki. W każdym z tych dwóch kładów możemy znaleźć szczepy klasyfikowane wcześniej do różnych gatunków np. *A. maxima* CS-328 i *A. platensis* C1 w kładzie I lub *A. platensis* Paraca, *A. fusiformis* CCALA023 w kładzie II. W związku z tym nasuwa się pytanie – jakie nazwy gatunkowe powinny nosić szczepy tych dwóch kładów zgodnie z International Code of Nomenclature of Prokaryotes?

Badając odporność cyjanobakterii na różnego rodzaju czynniki stresowe Autorka stwierdziła, że poziom tolerancji na stresory jest różny dla poszczególnych szczepów. Ważnym jest stwierdzenie, że profile kwasów tłuszczowych nie są markerem taksonomicznym, jak przez wiele lat uważano i wręcz wymagano ich badania przy opisie nowych gatunków, co jednocześnie jest zbieżne z obecnymi opiniami taksonomistów na temat analizy FAME dla wielu innych rodzajów bakterii.

Analizy metagenomiczne mikrobiomu związanego z biomasami *Arthrospira* wykazały istnienie bakterie koegzystujących z cyjanobakteriami, które można było zaklasyfikować do czterech głównych grup. Udział poszczególnych grup w badanych biomasach był różny, a Doktorantka zobrazowała go przy zastosowaniu programu Krona. Szkoda jednak, że w wizualizacji mikrobiomu dla różnych biomas ta sama grupa bakterii nie jest oznaczona tym samym kolorem – ułatwiłoby to porównanie między wykresami.

Mgr A. E. Misztak jako jeden z wyników analiz mikrobiomu wysuwa propozycję utworzenia nowego rodzaju i gatunku bakterii - *Arthrospirobacter rubrum*. Choć w mojej opinii przedstawione wyniki nie uprawniają w pełni do wysunięcia takiej propozycji, gdyż brakuje analiz filogenetycznych na podstawie 16S rDNA i innych genów metabolizmu podstawowego dla szczepów typowych najbliższej spokrewnionych gatunków. Niemniej jednak przynależność do odrębnego taksonu pięciu odmiennych szczepów jest wielce prawdopodobna. Chciałabym zapytać na jakiej podstawie Autorka stwierdziła, że badane szczepy tworzą nowy rodzaj, a nie są tylko nowym gatunkiem w obrębie znanego rodzaju? Tak jak kryteria klasyfikacji do gatunków obecnie są dobrze zdefiniowane, brak jest jasnych wytycznych przy tworzeniu nowych rodzajów, a dyskusja taksonomistów na ten temat jest dosyć ożywiona.

W rozdziale **Discussion**, który został napisany jasno, ciekawie i wskazuje na umiejętności Doktorantki w zakresie interpretacji i dyskusji wyników badań, mgr A. E. Misztak dociekliwie rozpatruje i porównuje uzyskane wyniki z wynikami innych autorów. Wartościowym jest spojrzenie na badane zagadnienia nie tylko od strony badań podstawowych, ale także od strony praktycznej na aspekty związane z problemami produkcji biomasy cyjanobakterii do celów np. spożywczych. Doktorantka cytuje w rozprawie 207 pozycji literaturowych, głównie anglojęzycznych publikowanych zarówno wiele lat temu jak i bardzo współczesnych, co wskazuje na dogłębną znajomość tematu i ciągłe śledzenie tego co się w światowych badaniach związanych z cyjanobakteriami dzieje.

Pracę kończy krótki rozdział **Conclusion**, gdzie Autorka wyszczególnia najważniejsze wnioski ze swojej pracy. Rozdział ten jest również podsumowaniem wniosków publikowanych po każdej z części wyników.

Przedstawioną do recenzji pracę oceniam bardzo dobrze. Za niezwykle cenny uważam dobór tematyki i zakres prac. Autorka połączyła badania podstawowe, poszerzające wiedzę o zróżnicowaniu i pokrewieństwie mikroorganizmów z aspektami o znaczeniu praktycznym. Pani mgr A. E. Misztak wykazała się umiejętnościami prawidłowego planowania eksperymentów, trafnego wykorzystania nowoczesnych technik badawczych, a także interpretacji uzyskanych wyników. Badania genomów i ich analiza, a także analizy metagenomiczne Arthrobiomu wymagały zastosowania nowoczesnych metod sekwencjonowania nowej generacji i mają charakter pionierski dla badań nad *Arthrospira*. Uzyskane wyniki niewątpliwie mają duże znaczenie poznawcze i to w skali światowej. Cała

praca napisana jest jasno i klarownie, posiada prawidłowy układ i strukturę, a niewielkie uchybienia językowe nie rzutują na jej całokształt.

Podsumowując, uważam, że przedstawiona do oceny praca odpowiada warunkom stawianym rozprawom doktorskim. Wnoszę zatem do Wysokiej Rady Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG i GUMed o dopuszczenie Pani mgr Agnieszki Emilii Misztak do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie biorąc pod uwagę wysoki poziom naukowy rozprawy wnioskuję o jej wyróżnienie.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "J. Piątek". The signature is written in a cursive, flowing style.